

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR05/000743

International filing date: 29 March 2005 (29.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR
Number: 0403319
Filing date: 30 March 2004 (30.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 13 June 2005 (13.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 29 MARS 2005

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planche', enclosed within a large, stylized oval loop.

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr





26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

☎ 0 825 83 85 87

0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Réservé à l'INPI

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*04

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 @ W / 030103

REMISE DES PIÈCES DATE 30 MARS 2004 LIEU 75 INPI PARIS 26Bis SP N° D'ENREGISTREMENT 0403319 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 30 MARS 2004		<input checked="" type="checkbox"/> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE SANTARELLI 14, avenue de la Grande Armée 75017 PARIS	
Vos références pour ce dossier <i>(facultatif)</i> BIF116236FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> N° _____ Date _____ <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> N° _____ Date _____			
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i> N° _____ Date _____			
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) N-désoxyribosyltransférases de Lactobacillus fermentum et application à la synthèse enzymatique de 2',3'-didésoxynucléosides et de 2',3'-didéhydro-2',3'-didésoxynucléosides.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		INSTITUT PASTEUR	
Prénoms			
Forme juridique		Fondation reconnue d'utilité publique	
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège	Rue	25-28, rue du Docteur Roux	
	Code postal et ville	75 015 PARIS	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		FRANCAISE	
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		N° de télécopie <i>(facultatif)</i>	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2^{ème} page



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES
DATE **30 MARS 2004**
LIEU **75 INPI PARIS 26Bis SP**
N° D'ENREGISTREMENT
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI **0403319**

DB 540 W / 191203

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		
Nom		
Prénom		
Cabinet ou Société		SANTARELLI
Nationalité		
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	14, Avenue de la Grande Armée
	Code postal et ville	75 017 PARIS
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		01 40 55 43 43
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		Choix à faire obligatoirement au dépôt (cf. Notice explicative Rubrique 3)
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG [] [] [] [] []
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Georges PERIN N° 92.1191 SANTARELLI		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI

5 La présente invention concerne de nouvelles N-désoxyribosyltransférases de *Lactobacillus fermentum* et leur application à la synthèse enzymatique de 2',3'-didésoxynucléosides et de 2',3'-didéhydro-2',3'-didésoxynucléosides.

10 Les analogues de nucléosides sont très largement utilisés dans les thérapies antivirales ou dans la chimiothérapie anti cancer. On peut citer par exemple la ddl (didanosine), la ddC (zalcitabine) et la d4T (stavudine) ou l'AZT (zidovudine) dans la thérapie anti-VIH, l'ACV (acyclovir) dans le traitement de l'herpès ou encore le GCV (ganciclovir) utilisé dans la thérapie anti tumorale en combinaison avec la thymidine kinase de l'herpès.

15 Les didésoxynucléosides tels ddl et ddC et leurs dérivés sont les inhibiteurs les plus efficaces connus à ce jour utilisés dans la thérapie contre le virus HIV.

20 La synthèse chimique de ces composés nécessite plusieurs étapes de protections, déprotections et purifications. Il serait donc souhaitable de pouvoir simplifier les procédures de synthèse de ce type de composés en développant des méthodes enzymatiques sélectives et hautement spécifiques.

25 Les N-désoxyribosyltransférases produites par les bactéries du genre *Lactobacillus* sont des enzymes qui catalysent le transfert de désoxyribose entre deux bases puriques ou pyrimidiques. Elles sont également capables en général de transférer le 2',3'-didésoxyribose entre ces mêmes bases (Carson et Wasson, 1988). Ainsi, plusieurs pyrazolo (3,4-d) pyrimidines et triazolo (4,5-d) pyrimidines dérivées de la 2',3'-didésoxycytidine et de la base correspondante ont pu être synthétisées à partir d'enzymes de *Lactobacillus leichmannii* et *Lactobacillus helveticus* (Fischer et coll, 1990). La réaction de
30 transfert de 2',3'-didésoxyribose est toutefois nettement moins efficace que celle effectuée avec le 2'-désoxyribose.

On a trouvé dans le cadre de la présente invention que

l'introduction de mutations dans la N-désoxyribosyltransférase de *Lactobacillus fermentum* (*L. fermentum*), suivie d'une confrontation avec un analogue du substrat naturel au sein du criblage sélectif permettait d'obtenir une protéine mutée ayant une forte activité sur le nouveau substrat. En répétant ces
 5 opérations, il est apparu possible d'obtenir des enzymes présentant une activité sur des substrats de plus en plus éloignés du substrat naturel initial.

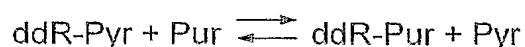
C'est à la suite d'une étape de mutagenèse aléatoire dans un gène *ntd* de *L. fermentum*, suivie d'une étape de sélection utilisant un crible génétique fonctionnel qu'il a été possible d'isoler des mutants ayant une activité
 10 spécifique plus importante, notamment pour le transfert de 2',3'-didésoxyribose.

Ce procédé de sélection d'enzymes modifiées plus actives fait plus particulièrement intervenir comme crible génétique la souche *E.coli* PAK 9 (déposée à la CNCM le 27 Juin 2002 sous le numéro d'accèsion I-2902), laquelle est de génotype $\Delta pyrC :: Gm$, $\Delta codA :: Km$, *cdd* :: *Tn10*.

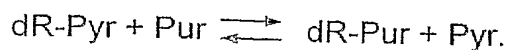
15 Cette souche permet de sélectionner la production d'uracile car elle est déléetée pour le gène *pyrC* qui commande la conversion de carbamyl aspartate en dihydroorotate ainsi que pour les gènes *codA* et *cdd* qui commandent respectivement la désamination de la cytosine et de la (désoxy)cytidine. Elle présente donc une exigence en uracile (u) qui ne peut
 20 être satisfaite que par l'apport d'uridine (R-U), de désoxyuracile (dR-U) ou de didésoxyuracile (ddR-U). Cependant l'utilisation de didésoxyuracile (ddR-U) peut être sélectionnée dans la souche PAK9 uniquement si un variant de la N-désoxyribosyltransférase est capable de réaliser une des deux réactions suivantes:

- 25 i) $ddR-U \longrightarrow U + ddR$,
 ii) $ddR-U + C \rightleftharpoons ddR-C + U$.

Les clones transformants de PAK 9 exprimant un gène *ntd* de *L. fermentum* muté aléatoirement, ont ainsi été sélectionnés en milieu minéral
 30 glucose additionné de didésoxyuracile (ddR-U) et de cytosine (C). Plusieurs transformants ont été obtenus et sont capables de réaliser l'échange



ainsi que



Les séquences nucléotidiques des différents variants de *ntd* de
5 *L. fermentum* peuvent différer du gène sauvage que d'une seule mutation. Leurs activités enzymatiques ont été évaluées à partir d'extraits bruts ou des protéines purifiées. L'activité spécifique de NTD* peut être 10 fois inférieure à celle de NTD pour le transfert de désoxyribose mais peut être 7 fois supérieure pour le transfert de didésoxyribose.

10 L'enzyme sélectionnée trouve son application dans la synthèse enzymatique de 2',3'-didésoxynucléotides et de 2',3'-didéhydro-2',3'-didésoxynucléosides de bases naturelles ou modifiées (5-halogéno-pyrimidines), comportant ou non des radioéléments. Le procédé peut être étendu à la sélection de variants capables de transférer des dérivés de
15 2'-désoxyribose ou 2',3'-didésoxyribose entre bases (tel que, 3'-amino-2',3'-didésoxyribose ou 3'-azido-2',3'-didésoxyribose).

En outre, dans le procédé selon l'invention, on peut utiliser des cellules dans lesquelles une voie métabolique a été inactivée. Le crible sélectif consiste à compléter cette déficience en produisant le produit P pour lequel
20 les cellules sont auxotrophes à partir d'un analogue du substrat naturel de la protéine X.

Alternativement, on peut faire évoluer une protéine X par complémentation d'une protéine apparentée Y, X et Y appartenant tous deux à la même classe de la nomenclature enzymatique EC ou à des classes voisines.
25

DESCRIPTION

Ainsi, de manière générale, la présente invention se rapporte à un procédé d'évolution artificielle *in vitro* et *in vivo* d'une protéine X codée par un
30 gène *ntd* de *L. fermentum*, ledit procédé permettant de faire évoluer *in vivo* ladite protéine X par complémentation soit d'une protéine apparentée, soit par complémentation d'une voie métabolique inactivée.

Un tel procédé permet de faire évoluer une protéine X codée par un gène *ntd* de *L. fermentum* de sorte à en modifier ses caractéristiques par les étapes suivantes :

- 5 a) obtention de mutants du gène *ntd* de *L. fermentum* par mutagenèse aléatoire ;
- b) transformation de cellules comportant un phénotype [P-] avec des vecteurs comportant les acides nucléiques mutés obtenus à l'étape a) codant pour les protéines ainsi modifiées X*, P- signifiant que lesdites cellules sont auxotrophes pour la substance P, P étant le produit de l'action de X sur son
10 substrat naturel S ;
- c) mise en culture desdites cellules dans un milieu comprenant un substrat S*, S* étant un analogue du substrat naturel S de ladite protéine X;
- d) sélection des cellules [P- :: X*] qui ont survécu à l'étape c) dans lesquelles les protéines X* sont capables de réaliser la biosynthèse du produit P à partir du
15 substrat S*.

La protéine mutante X* obtenue est une protéine possédant une activité voisine de celle de la N-désoxyribosyltransférase naturelle X. X* appartient ainsi à des classes enzymatiques communes ou voisines des N-désoxyribosyltransférases présentant au moins les trois premiers chiffres des
20 classes EC de la nomenclature internationale à 4 chiffres. Pour le passage d'une classe à une autre, on peut répéter le procédé mentionné ci-dessus avec à chaque passage l'addition d'une modification supplémentaire sur l'analogue de substrat désigné par S*.

Par "analogue de substrat", on entend le substrat S naturel de la
25 protéine X naturelle comportant une modification ou une altération. Par "modification de ce substrat", on entend l'addition ou la suppression d'au moins un atome, un groupe ou substituant, la modification de la conformation spatiale du substrat (isomère, énantiomère, diastérisomère). Cette modification peut être minime ou importante du point de vue structurel. Dans le cas où on
30 cherche à modifier de manière substantielle l'activité de la protéine (ou enzyme), on peut procéder par répétition du procédé en modifiant d'avantage le substrat S* à chaque nouveau cycle de sélection. Peu à peu, la protéine

accumule des mutations qui sont responsables de la modification de son activité.

Dans ce procédé, les cellules utilisées à l'étape b) sont obtenues par inactivation d'un moins un gène impliqué dans la voie métabolique naturelle conduisant au produit P.

Ainsi, la protéine X* obtenue complémente la déficience de la voie métabolique naturelle conduisant au produit P dans un milieu pourvu du substrat S*.

Par "complément", on entend la suppression du phénotype auxotrophe résultant de l'inactivation du gène ou de la voie métabolique.

Alternativement, les cellules peuvent être des cellules dans lesquelles le gène codant pour une protéine apparentée à X a été inactivé au préalable.

Par "inactivation", on entend une délétion en tout ou en partie, une insertion, ou une mutation rendant inopérant le gène. L'inactivation peut également consister en une modification conduisant à un phénotype du type Ts (température sensible). Dans ce cas, les cellules sont cultivées à des températures non permissibles pendant la phase de sélection (étapes c) et d)).

De préférence, la protéine apparentée Y précédemment citée possède au moins les trois premiers chiffres (2.4.2) de la nomenclature internationale EC à 4 chiffres (tableau 1), plus particulièrement fait partie de la classe EC 2.4.2.6 (N-désoxyribosyltransférases).

TABLEAU 1

Numéro EC	Nom selon la nomenclature internationale
2.4.2.5	Nucleoside ribosyltransférase.
2.4.2.6	Nucléoside déoxyribosyltransférase.
2.4.2.7	Adenine phosphoribosyltransférase
2.4.2.8	Hypoxanthine phosphoribosyltransférase.
2.4.2.9	Uracil phosphoribosyltransférase.
2.4.2.10	Orotate phosphoribosyltransférase.
2.4.2.11	Nicotinate phosphoribosyltransférase.
2.4.2.12	Nicotinamide phosphoribosyltransférase.
2.4.2.14	Amidophosphoribosyltransférase.
2.4.2.17	ATP phosphoribosyltransférase.
2.4.2.18	Anthranilate phosphoribosyltransférase.
2.4.2.20	Dioxotetrahydropyrimidine phosphoribosyltransférase.
2.4.2.21	Nicotinate-Nucléotide-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransférase.
2.4.2.22	Xanthine-guanine phosphoribosyltransférase.
2.4.2.29	Queuine tRNA-ribosyltransférase.
2.4.2.30	NAD(+) ADP-ribosyltransférase.
2.4.2.31	NAD(P)(+)-arginine ADP-ribosyltransférase.
2.4.2.36	NAD(+)-diphthamide ADP-ribosyltransférase.
2.4.2.37	NAD(+)-dinitrogeN-reductase ADP-D-ribosyltransférase.

Avantageusement, l'activité de la N-déoxyribosyltransférase X sur le substrat S est au moins 2, 5, 10, 25, 50, 100 ou 1000 fois supérieure à son activité sur le substrat S*. Parallèlement, l'activité de la protéine X* sur le substrat S* est au moins 5, 10, 25, 50, 100 ou 1000 fois supérieure à son activité sur le substrat S.

La mutagénèse aléatoire de l'étape a) peut être effectuée soit par variation de la concentration en manganèse lors de la réaction PCR, soit par utilisation d'analogues de nucléotides promutagènes ou encore par la mise en œuvre d'amorces comprenant une séquence aléatoire. Différentes techniques

sont décrites dans les documents US 6,323,030 (Methods for generating polynucleotides having desired characteristics by iterative selection and recombination), US 6,177,263 (Recombination of polynucleotide sequences using random or defined primers), WO 01/66798 (Random truncation and amplification of nucleic acid), and EP1205547 (DNA mutagenesis by random fragmentation and reassembly).

Les cellules utilisées dans le cadre de l'invention sont des cellules procaryotes ou eucaryotes, de préférence *E. coli*.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention vise un procédé tel que décrit ci-dessus pour faire évoluer une N-désoxyribosyltransférase (DTP) de sorte à obtenir une N-didésoxyribosyltransférase, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) obtention de mutants DTP* de la séquence du gène *ntd* de *L. fermentum* codant pour une N-désoxyribosyltransférase (DTP) par mutagenèse aléatoire ;
- b) transformation de cellules comportant un phénotype [N-] avec des vecteurs comportant les acides nucléiques mutés obtenus à l'étape a) codant pour les protéines DTP*, N- signifiant que lesdites cellules sont auxotrophes pour au moins un nucléoside, ledit nucléoside étant le produit de l'action de DTP sur son substrat naturel dR-N ;
- c) mise en culture desdites cellules dans un milieu comprenant un substrat ddR-N ;
- d) sélection des cellules [N- :: DTP*] qui ont survécu à l'étape c) dans lesquelles les protéines DTP* sont capables de réaliser le transfert du didésoxyribose (ddR) d'un didésoxyribonucléoside à un autre nucléoside conduisant à la production du nucléoside N nécessaire pour la survie des cellules.

Par "nucléoside N", on entend un nucléoside naturel, c'est à dire des molécules constituées d'un sucre relié à une base hétérocyclique par une liaison N-glycosidique, les bases étant des pyrimidines (thymine, uracile, cytosine) ou des purines (adénine, guanine parmi les bases usuelles). Par "N- ", on entend un phénotype [A-, T-, G-, C-, U- ou I-].

L'enzyme NTD* obtenu peut être capable de reconnaître et transférer un analogue de désoxyribose tel que le didésoxyribose, mais également d'agir sur des analogues de nucléoside. Ainsi, l'analogue de substrat S* utilisé peut être un analogue de désoxyribonucléoside ou didéhydro-didésoxyribonucléosides comportant au moins une modification chimique sur la
5 base et/ou sur le ribose.

Plus particulièrement, la séquence codante (*ntd*) de la N-désoxyribosyltransférase (DTP) de *L. fermentum* correspond à SEQ ID No 1.

Dans ce procédé, on peut utiliser à l'étape b) des bactéries de
10 génotype $\Delta pyrC$, $\Delta codA$, Δcdd déficientes dans la voie métabolique conduisant à l'uracile. La souche d'*E.coli* PAK 9 déposée à la CNCM le 27 Juin 2002 sous le N° I-2902, est particulièrement adaptée à cet usage.

Avantageusement, la présente invention vise, à partir du procédé décrit ci-dessus, à obtenir à partir de la protéine X codée par *ntd* de
15 *L. fermentum*, une protéine mutée présentant une activité N-didésoxyribosyltransférase et/ou une activité sur des analogues de désoxy ou didésoxyribonucléoside comportant une base modifiée. La séquence de la protéine ainsi mutée présente en général un pourcentage d'identité supérieur ou égal à 70 %, notamment 80 %, préférentiellement supérieur ou égal à 90 %, et plus préférentiellement supérieur ou égal à 95 % avec la séquence SEQ ID
20 No.2. Il est en outre important que certains résidus de la séquence ID No.2 soient conservés pour que ladite protéine mutée présente une activité enzymatique optimale. C'est le cas en particulier des résidus Y13 (tyrosine en position 13), D77 (acide aspartique en position 77), D97 (acide aspartique en position 97), E103 (acide glutamique en position 103), M132 (méthionine en position 132). Ainsi, certains variants peuvent présenter un pourcentage d'identité avec la séquence ID No. 2 compris entre 70 % et 80 % dans les régions qui sont situées en dehors du site catalytique de l'enzyme constitué par
25 lesdits résidus. Ces variants présentent alors une séquence identique au moins à 70 % à SEQ ID No.2, dans laquelle les résidus Y13, D77, D97, E103, M132
30 sont conservés, de préférence au moins à 80 %.

Une protéine mutée particulièrement préférée de l'invention

comprend la mutation A15T, comme par exemple la protéine de séquence SEQ ID No 4.

L'invention concerne également un acide nucléique comprenant une séquence de *ntd* mutée (NTD*) codant pour une protéine mutée telle que
5 définie précédemment et ayant une activité N-désoxyribosyltransférase et/ou une activité sur des analogues de désoxy ou didésoxyribonucléoside comportant une base modifiée mutée. Un acide nucléique préféré de l'invention comprend la séquence SEQ ID No 3, lequel code pour la protéine correspondant à SEQ ID No.4.

10 L'invention porte également sur un vecteur d'expression comprenant un acide nucléique tel que défini ci-dessus, en particulier la séquence SEQ ID No.3. Cette séquence peut être fusionnée à un promoteur efficace pour l'expression de toute ou partie de ladite séquence dans les cellules eucaryotes et/ou procaryotes. Le vecteur peut être un plasmide capable
15 de transformer et de se maintenir chez *E. coli*. Le vecteur peut se maintenir dans la bactérie de manière stable ou transitoire.

L'invention vise également une cellule hôte comprenant un vecteur tel que décrit précédemment.

Dans un autre aspect, l'invention se rapporte à l'utilisation d'une
20 N-didésoxyribosyltransférase décrite ci-dessus pour le transfert d'un didéoxyribose (ddR) d'un didésoxyribonucléoside sur un autre nucléoside, en particulier dans le but d'obtenir la synthèse de 2',3'-didesoxynucléosides et de 2',3'-didéhydro-2',3'-didesoxynucléosides.

Cet enzyme obtenue à partir du procédé selon l'invention est
25 particulièrement utile pour la préparation d'analogues de nucléosides possédant des propriétés antitumorales, notamment du ddl ou ddC.

Ainsi, l'invention porte également sur un procédé de préparation de composés comprenant une étape consistant à mettre en œuvre une protéine mutée définie ci-dessus.

30 Ce procédé est particulièrement avantageux pour la préparation d'analogues de nucléosides ou nucléotides utiles pour le traitement du cancer ou de maladies infectieuses, notamment des didésoxyribonucléosides, en

particulier le ddC ou ddl **et de 2',3'-didéhydro-2',3'-didésoxynucléosides.**

On se référera aux légendes des figures ci-après pour la suite de la description.

5 Légendes

- Figure 1 : Voies de biosynthèses

- figure 1a) la synthèse "de novo" de l'ADN à partir de précurseurs simples.
- figure 1b) la voie de sauvegarde ou de recyclage bien moins coûteuse en énergie et impliquant des réactions de transfert de sucre à partir de bases préformées (issues de la dégradation hydrolytique d'acides aminés et de nucléotides).

- Figure 2 : Cycle catalytique de NTD

- Figure 3 : Alignement de séquences, de Ntd montrant les résidus Y(Tyr)13, D(Asp)77, D(Asp)97, E(Glu)103 et M (Met)132 faisant partie du site catalytique. Lh : *lactobacillus helveticus*; La : *lactobacillus acidophilus*, Lj : *lactobacillus johnsonii*, Li : *lactobacillus leichmanni*, Lf : ***lactobacillus fermentum***, Lm : *leuconostoc mesenteroides*, Pro mar : *prochlorococcus marinus*.

20 EXEMPLE 1 : Synthèse enzymatique de nucléosides

La synthèse des nucléosides chez *E. coli* peut se faire selon deux procédés ; [Agnete MUNCH-PETERSEN (1983). "Metabolism of nucleotides, nucleosides and nucleobases in microorganisms" published by Academic Press] (voir figures 1a et 1b).

Il existe deux classes d'enzymes qui catalysent le transfert d'un 2-désoxyribosyle vers une base azotée ; voir ci-après et [Jane R. HANRAHAN & David W. HUTCHINSON (1992). "The enzymatic synthesis of antiviral agents". Journal of Biotechnology; vol.23; 193-210. Celles-ci sont parfois employées pour la synthèse d'analogues de nucléosides].

Les N-désoxyribosyltransférases catalysent le clivage des liaisons glycosidiques des 2-désoxynucléotides. Elles sont présentes chez certains

micro-organismes qui ne possèdent pas ou peu de purine et de pyrimidine phosphorylase (lactobacilles par exemple) [6-8]. Elles participent au recyclage des nucléotides.

5 Réactions catalysées selon le type d'enzymes

Deux types d'enzyme ont été caractérisés, [José HOLGUIN & Robert CARDINAUD (1975). "Trans-N-Deoxyribosylase: substrate specific studies". European Journal of Biochemistry; vol.54; 515-520].

10 Purine désoxyribosyltransférase ou NTD I :

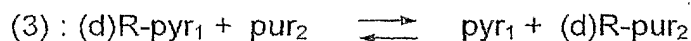
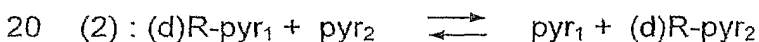
Elle catalyse exclusivement le transfert réversible d'un sucre d'une base purique (base donneuse) vers une autre purine (base receveuse).



15

Pyrimidine/Purine désoxyribosyltransférase ou NTD II :

Elle catalyse majoritairement le transfert entre purine et pyrimidine selon les équations réversibles suivantes :



Mécanisme réactionnel (figure 2)

25 Si on s'en tient à ce qui est connu chez *Lactobacillus delbruckii*, NTD II de réagirait selon un mécanisme "ping-pong-bi-bi" qui ferait intervenir deux substrats et deux produits [José HOLGUIN & Robert CARDINAUD (1975). "Trans-N-Deoxyribosylase: Purification by affinity chromatography and characterisation". European Journal of Biochemistry; vol.54; 505-514 ; C. DANZIN & Robert CARDINAUD (1974). "Deoxyribosyl transfer catalysis with trans-N-deoxyribosylase. Kinetic studies of purine to purine trans-N-deoxyribosylase. European Journal of Biochemistry; vol. 48; 255-252 ;

C. DANZIN & Robert CARDINAUD (1976). "Deoxyribosyl transfer catalysis with trans-N-deoxyribosylase. Kinetic studies of purine (pyrimidine) to purine (pyrimidine) trans-N-deoxyribosylase. European Journal of Biochemistry; vol.62; 356-372].

5 On suppose que le sucre du nucléoside donneur (dBase₁) se lie de façon covalente à l'enzyme. Une réaction intramoléculaire au sein de ce complexe binaire permet le clivage de la liaison β -glycosidique et la formation d'un complexe ternaire E-désoxyribosyl-Base₁ suivie de la libération du premier produit (Base₁). La base acceptrice (Base₂) se fixe alors sur l'intermédiaire
10 binaire et après réaction intramoléculaire sur le site actif de l'enzyme, le second produit (dBase₂) est libéré. L'enzyme peut dès lors mener une autre catalyse.

Propriétés physico-chimiques

Chez *Lactobacillus delbruckii*, les deux enzymes ont un poids
15 moléculaire voisin (évalué aux alentours de 100 kDa) mais elles diffèrent par leur stabilité thermique (activité observée jusqu'à 45°C pour NTD I et 55°C pour NTD II) et leur pH optimum (6.4 pour NTD I et 6.0 pour NTD II).

Le gène *ntd* de *Lactobacillus delbruckii* codant pour NTD II d'une longueur de 471 bp code pour la synthèse d'une protéine de 157 acides aminés
20 et de poids moléculaire total de 110 kDa [William J.COOK, Steven A. SHORT & Steven E. EALICK (1990). "Crystallization & preliminary X-ray investigation of recombinant *Lactobacillus leichmanii* nucleoside 2-deoxyribosyltransférase". The Journal of Biological Chemistry; vol.265; No.5; 2682-2683]. La structure cristalline de l'enzyme NTD II de *L. delbruckii* a été déterminée avec une
25 résolution de 2,5 Å. C'est un hexamère (trimère de dimères) constitué de six sous-unités identiques de 18 kDa. Chaque sous-unité possède au centre un feuillet β parallèle composé de cinq brins de longueurs diverses et entouré par quatre hélices α disposées de façon asymétrique. Chacune comprend un site actif, mais les six centres catalytiques, distants deux à deux d'environ 20 Å,
30 requièrent la participation des chaînes latérales des sous-unités voisines [Shelly R. ARMSTRONG, William J.COOK, Steven A. SHORT & Steven E.

- EALICK (1996). "Crystal structures of nucleoside 2-deoxyribosyltransférase in native & ligand-bound forms reveal architecture of the active site". Structure; vol.4; No.1; 97-107]. Ces dernières sont impliquées dans le positionnement de l'acide aminé catalytique (le glutamate 98) [David J.T. PORTER, Barbara M. MERRIL & Steven A. SHORT (1995). "Identification of the active site nucleophile nucleoside 2-deoxyribosyltransférase as glutamic acid 98". The Journal of Biological chemistry; vol.270; No.26; 15551-15556].

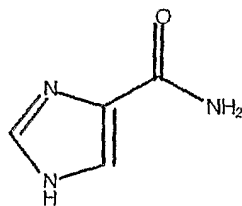
Synthèse enzymatique d'analogues de nucléosides

- 10 Les réactions de transfert, hautement stéréospécifiques, produisent en présence d'une transférase NTD I ou NTD II, exclusivement l'anomère β du nucléoside (ce qui évite l'étape de séparation des isomères α et β).

- L'enzyme possède une grande spécificité vis-à-vis des
15 2'-désoxyribonucléotides mais tolère un grand nombre d'analogues modifiés sur le sucre ou sur la base. La thymidine et la cytosine semblent les plus efficaces donneurs de sucre. D'autre part le transfert peut s'effectuer sur un large panel de bases receveuses. Citons par exemple les purines substituées en position 6 [D. BETBEDER, D.W. HUTCHINSON & A.O. RICHARDS (1989). "The
20 stereoselective enzymatic synthesis of 9- β -D-2',3'-dideoxynucleosides of N(6)-substitued purines". Antiviral Chem. Chemother ; vol.17; 4217-4222] et dYTP.

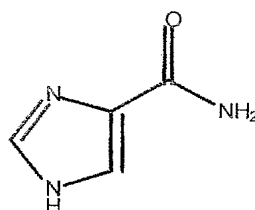
dYTP :

- 25 L'imidazole-4-carboxamide noté Y a été proposé comme purine simplifiée. Cet analogue a pour formule:



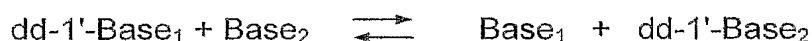
Il a été rapporté que le nucléotide dYTP pouvait se substituer à dATP ou dGTP lors de la copie de l'ADN ce qui introduit des mutations. On peut également citer les composés décrits WO 01/96354 (Institut Pasteur) de formule générale :

5



Les enzymes NTD se révèlent capables de catalyser de façon marginale la réaction d'échange entre un 2',3'-didésoxyribose et une base acceptrice :

10



dd = 2',3'-didésoxyribose

15

Néanmoins la vitesse de ce transfert reste très faible comparée à celle caractérisant l'échange de désoxyriboses.

20

Les 2',3'-didésoxyribonucléotides présentent un intérêt évident en tant que terminateurs de chaîne dans les procédures de séquençage. De plus la 2',3'-didésoxyadénosine (ddA) et la 2',3'-didésoxyinosine (ddI) sont utilisés à des fins thérapeutiques notamment dans le cas du virus du SIDA: ces analogues inhibent de manière efficace la réplication du VIH (virus d'immunodéficience humaine) [H. MITSUYA & S. BRODER (1987). "Strategies for antiviral therapy in AIDS". Nature ; vol. 325 ; 773-778].

25

A cette fin, l'invention apporte un nouveau procédé d'obtention de mutants de l'enzyme NTD II afin de sélectionner des enzymes mutantes de *L. fermentum* qui ont une plus forte spécificité envers les 2',3'-didésoxyribonucléosides que l'enzyme native.

EXEMPLE 2 :**Application du procédé selon l'invention pour l'obtention de NTD*****MATERIELS ET METHODES**

5 Les souches d'*E. coli* PAK9 sont cultivées en milieu Luria-Bertani (LB) ou en milieu minimum MS (Richaud et coll 1993). Les antibiotiques kanamycine, Km, chloramphénicol Cm, sont utilisés à la concentration finale de 25µg/ml ; tetracycline, Tc et gentamycine, Gm, 10µg/mL. Les nucleosides et bases sont utilisés dans les milieux de culture à la concentration finale de
 10 0,3mM. Les techniques de biologie moléculaire ont été faites selon Sambrook et coll (1989)

Les produits d'amplification sont purifiés à l'aide du QIAquick PCR purification (QIAgen)

15 Les fragments d'ADN purifiés sur gel d'agarose sont extraits à l'aide du Kit Jetsorb (Genomed) ou du kit QIAquick gel extraction (QIAgen). L'ADN plasmidique est purifié à l'aide du kit QIAprep spin miniprep (QIAgen)

La souche PAK9 (MG1655 Δ pyrC ::Gm, Δ codA ::Km, *cdd* ::Tn10) est disponible auprès de la CNCM (Collection Nationale de Culture des Microorganismes) à l'Institut Pasteur, 25-28 rue du Dr Roux 75224 Paris cedex
 20 15, sous le N° I-2902.

Le vecteur pSU19N a été obtenu par mutagénèse dirigée du plasmide pSU19 [B. BARTOLOME, J. JUBETE, E. MARTINEZ & F. DE LA CRUZ (1991) " constructions and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives" Gene; vol.102; 75-
 25 78; E. MARTINEZ, B. BARTOLOME & F. DE LA CRUZ (1988) "pACYC184-derived cloning vectors containing the multiple cloning site and lacZ alpha reporter gene of pUC8/9 and pUC18/19 plasmids" gene; vol 68(1); 159-162] à l'aide des oligonucléotides

PAK 23 5'-P-CAATTTACACAGGAAACACATATGACCATGATTACGCC (SEQ. ID N° 5)

30 **PAK 24** 5'-P-TGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAC (SEQ. ID N°6)

Un gène *ntd* de *L. fermentum* a été amplifié par PCR à partir du plasmide pLF6 utilisé ici en tant que matrice d'ADN. Le plasmide pLF6 propagé

à partir de la souche *E.coli* PAK6 déposée à la CNCM le 2 mai 2001 sous la référence I-2664, contient un fragment *Alu I* de 1,36 kb du gène codant la N-désoxyribosyltransférase de type II issu de la souche *L.fermentum* CIP102780T. Pour amplifier ce fragment d'ADN, les oligonucléotides suivants

5 ont été utilisés:

PAK 5 5'-GATATACATATGAAAAATACCGACCCAGTTGC (SEQ. ID N°7) et

PAK 6 5'-NNGGATCCTTAGGTTAGTTAGAAAACCTTGAATGGTGGG (SEQ. ID N°8),

puis les fragments amplifiés ont été digérés par les enzymes de restriction *BamHI* et *NdeI* et clonés dans le vecteur pSU19N. Dans cette construction,

10 l'expression de la protéine est sous le contrôle du promoteur *lac*.

1) Mutagénèse

Les amorces T7prom (5'-TTAATACGACTCACTATAGGGG) (SEQ. ID N°9) et T7term (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG) (SEQ. ID N°10) ont

15 été utilisés pour amplifier le gène *ntd* cloné dans le plasmide pET24a (Novagen) selon des conditions standard d'amplification à l'aide du GeneMorph PCR Mutagenesis Kit (Stratagene, USA). Les paramètres d'amplification : 1 cycle de 5' à 95°C, 30 cycles comportant chacun les trois étapes suivantes : 30" à 95°C, 30" à 51,5°C, 1' à 72°C, puis un cycle de 10' à 72°C. Les

20 concentrations d'ADN matrice utilisées : 10ng et 10pg.

2) Clonage et sélection

Les produits d'amplification purifiés sont digérés durant 2 heures à 37°C par les enzymes de restriction *BamHI* et *NdeI*. Après migration à 150V

25 durant 45 min, ils sont purifiés par extraction du gel d'agarose à 1 % à l'aide du kit QIAquick gel extraction (QIAgen).

Le plasmide pSU19N est digéré par les mêmes enzymes et purifié selon la même procédure.

Les ligatures réalisées dans un volume de 20 µL comprennent

30 15 ng des produits d'amplification, 50ng de pSU19 digéré par *BamHI-HindIII*, 2 µL de tampon de réaction 10x concentré de la T4 ADN ligase et 6U de T4 ADN ligase. La réaction est effectuée à 16°C durant 18 heures.

Les produits de ligature sont ensuite dialysés sur filtre Millipore (0,05 μ m ; 13 mm) pendant 30 min puis utilisés pour transformer la souche PAK9, préparée selon le protocole décrit par Dower et coll (1987), par électroporation.

5 1 à 5 μ L d'ADN ligaturé mélangés à 50 μ L de la souche PAK9 dans une cuvette de 2mm sont soumis à une charge de 2,5 kV. Après une incubation d'une heure à 37°C dans 1 ml de milieu LB supplémenté en uracile (0,3 mM), deux lavages successifs avec 1 ml milieu MS 1x sont effectués.

450 μ L de suspension sont étalés sur milieu gélosé minéral
10 glucose supplémenté en Cm, ddU et C. Les boîtes sont incubées à 37°C durant 4 jours. Les colonies sélectionnées sont ensuite isolées sur le même milieu.

L'ADN plasmidique des colonies isolées est préparé à partir de cultures en milieu LB supplémentées en Cm et U. Le séquençage des plasmides a été effectué par la société MWG-BIOTECH.

15 Le séquençage des plasmides présents dans les transformants de PAK 9 sélectionnés a permis d'identifier une mutation dans la séquence (*ntd*) ayant pour effet de substituer dans la séquence protéique correspondante (SEQ ID N°2) le résidu A en position 15 par un résidu T (mutation notée A15T).

20 **3) Mesure de l'activité enzymatique des extraits bruts des différents mutants**

3.1 Préparation des extraits bruts

Les précultures sont obtenues après inoculation d'une colonie
25 isolée dans 5 mL de milieu LB contenant Cm et U pour la souche PAK9 suivie d'une nuit d'incubation sous agitation à 37°C.

Le lendemain, 15 mL de milieu LB Cm et U sont inoculés à une $DO_{600} = 0,01$. Les cultures sont ensuite incubées à 37°C jusqu'à une DO comprise entre 0,8 et 1.

30 Les cellules sont ensuite centrifugées à 4000 rpm pendant 30 minutes à 4°C, le culot est remis en suspension dans 10 ml de tampon phosphate ($Na_2HPO_4 + NaH_2PO_4$) à 50 mM (pH=7,5). Après centrifugation, le

culot est remis en suspension dans 1 ml du même tampon. Les cellules, conservées dans de la glace, subissent alors trois cycles de 30 s de sonication et 30 s de repos. Après centrifugation à 12000 rpm durant 2x15 minutes à 4°C; les surnageants sont récupérés et stockés à -20°C.

5

3. 2 Réaction enzymatique

50 µL d'extrait enzymatique sont additionnés à 200 µL de tampon citrate à 100 mM pH 6,44 en présence de ddU ou dU à 3 mM final et de C à 1 mM final pour la souche PAK9, le tout est incubé à 37°C. L'avancement de la réaction est suivi par CCM (Silice ; éluant : MeOH- CH₂Cl₂ (20/80)). Les produits sont révélés sous UV, et les sucres révélés par le réactif de Zücker La disparition des substrats et la formation des produits ont aussi été quantifiés par analyse en HPLC. Les différents produits sont séparés par HPLC analytique avec une colonne phase inverse (100-5C18) en utilisant un débit de 1ml/min et un gradient linéaire 5-25% CH₃CN dans un tampon triéthylammonium acetate 10mM à pH 7,5 pendant 20 min.

10

15

4) Surproduction et purification de la N-désoxyribosyltransférase native et du mutant LFA15T.

20

Les oligonucléotides :

PAK 5 5'-NGATATACATATGAAAAATACCGACCCAGTTGC (SEQ. ID N°11) et

PAK 6 5'-NNGGATCCTTAGGTTAGTTAGAAAACCTTGAATGGTGGG (SEQ. ID N°12)

ont été utilisés comme amorce dans une réaction d'amplification dans des conditions standard en utilisant le gène *ntd* de *L. fermentum* cloné dans le pSU19 (pLF6) comme ADN matrice. Le produit d'amplification a été digéré par les enzymes de restriction *NdeI* et *BamHI* pendant 2h à 37°C, purifié sur gel d'agarose et inséré dans le plasmide pET24a digéré par les mêmes enzymes puis le mélange de ligature utilisé pour transformer la souche β 2033. L'ADN plasmidique des colonies a été préparé et digéré par les enzymes *NdeI* et *BamHI*. Ceux dont la séquence était correcte ont été utilisés pour transformer la souche BL21 (DE3)/pLysS (Novagen). L'ADN plasmidique du mutant

25

30

pSU19NLFA15T sélectionné précédemment a été préparé puis digéré par les enzymes *NdeI* et *BamHI*. Le fragment *NdeI* –*BamHI* correspondant a ensuite été inséré dans le plasmide pET24a digéré par les mêmes enzymes pour donner le plasmide d'expression pETLFA15T utile à l'expression de la protéine mutée. Une souche d'*E.coli* transformée à l'aide du plasmide pETLFA15T a été déposée à la CNCM le 22 mars 2004 sous le numéro d'accèsion I-3192. La surproduction des deux *N*-deoxyribosyltransférases, native et mutée, a été obtenue à partir de cultures de cette souche dans 500ml de milieu LB supplémenté en Km et Cm. Ces cultures ont été induites à une $DO_{600} = 0,6$ par addition d'IPTG (0,4mM), l'incubation étant poursuivie pendant 2h30 à 37°C.

Les cellules sont ensuite centrifugées 15' à 4000rpm à 4°C, lavées dans 50 ml de tampon phosphate puis le culot obtenu après centrifugation est conservé une nuit à -20°C. Le culot bactérien remis en suspension dans 20 ml de tampon phosphate est ensuite lysé par un passage à la presse de French à 14000psi. Le lysat est centrifugé pendant 90' à 50000 rpm. Le surnageant contenant les protéines solubles est ensuite précipité au sulfate d'ammonium (40 % saturation). Le précipité obtenu après centrifugation à 13900rpm (20000g) pendant 30' à 4°C est remis en suspension dans 1 ml de tampon phosphate 100mM pH7,5 NaCl 1,5M puis déposé sur une colonne gel filtration Sephacryl S200 (Amersham-Pharmacia). Les fractions sont ensuite analysées par gel SDS-PAGE et l'activité enzymatique déterminée. Les fractions les plus actives et les plus pures sont dialysées durant une nuit à 4°C contre le même tampon à pH=6,0. La concentration protéique est déterminée par mesure de la DO à 280 nm.

La mesure des activités enzymatiques est effectuée comme décrit dans le paragraphe 4.2.

5) Résultats

Les clones transformants de la souche d'*E.coli* PAK9, exprimant le gène *ntd* muté de *L. fermentans* ont été sélectionnés en milieu minéral glucose additionné de didésoxyuracile (ddR-U) et de cytosine (C).

Plusieurs transformants ont été obtenus et sont capables de

réaliser l'échange

ddR-Pyr + Pur \longleftrightarrow ddR-Pur + Pyr ainsi que dR-Pyr + Pur \longleftrightarrow dR-Pur + Pyr.

- Les séquences nucléotidiques des différents variants de *ntd* sont
- 5 identiques et ne diffèrent du gène sauvage que d'une mutation (indiquée en gras dans le tableau 2 ci-dessous). Dans les deux cas (*L. leichmannii* et *L. fermentum*) un acide aminé neutre (glycine et alanine) est remplacé par un acide aminé nucléophile (serine et thréonine respectivement). La conversion
- 10 *N*-désoxyribosyltransférase en *N*-didésoxyribosyltransférase ou *N*-didéhydro-
- ribosyltransférase semble donc nécessiter la substitution d'un acide aminé neutre par un acide aminé nucléophile qui doit contribuer au positionnement du sucre favorisant sa catalyse. Il est remarquable de noter dans le tableau 2 que toutes les *N*-désoxyribosyltransférases ainsi qu'un certain nombre de protéines
- (de fonction inconnue) homologues possèdent à cette position une glycine ou
- 15 une alanine.

TABLEAU 2

Origine du gène muté	Séquence protéique correspondante	
NTD <i>Lactobacillus. acidophilus</i>	MMAKTKTLYF	G AGWFNEKQNKAYKAAMEALKQN
NTD <i>Lactobacillus. helveticus</i>	MNKKKTLYF	G AGWFNEKQNKAYKEAMAALKEN
NTD <i>Lactobacillus. leichmannii</i>	MPKKTIYF	G AGWFTDRQNKAYKEAMEALKEN
NTD LIG9S	MPKKTIYF	S AGWFTDRQNKAYKEAMEALKEN
PTD <i>Lactobacillus. helveticus</i>	MKAVVPTG-KIYL	G SPFYSDAQRERAAKAKELLAKN
<i>Lactobacillus gasseri</i>	MTKQKTVYF	G AGWFTETQNKAY
NTD <i>Lactobacillus. fermentum</i>	LKNTDPVANTKIYL	A TSFFNEEQRRARIPQALAQLEAN
NTDLFA15T	LKNTDPVANTKIYL	I TSFFNEEQRRARIPQALAQLEAN
<i>Oenococcus oeni</i> MCW	MNMAKNIYL	A SPFFDDEQIARVKKIEKALESN
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 8293	KNVYL	A SPFFDKEQIERVERVEKALAAN
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	VYL	A APFFDEAQKERIQQVKSALLAN
<i>Lactococcus lactis</i> IL1403	NQAVNVYL	A APFFSESQIKK

- Les activités enzymatiques des *N*-désoxyribosyltransférases
- 20 natives et mutantes de *L. leichmannii* (LL et LL G9S) et de *L. fermentum* (LF et LF A15T) dans les réactions d'échange dT + C \longleftrightarrow dC + T, ddT + C \longleftrightarrow ddC +

T et d4T + C \longleftrightarrow d4C + T ont été évaluées à partir d'extraits bruts ou des protéines purifiées.

Les résultats reportés dans le tableau 3 ci-dessous montrent que l'activité spécifique du mutant LFA15T est inférieure à celle de l'enzyme native (LF) pour le transfert de désoxyribose mais que celle-ci est supérieure pour le transfert de didésoxyribose ou de didéhydroribose. Pour le transfert de désoxyribose, l'activité est diminuée d'un rapport de 7, tandis que celle-ci est augmentée par 3 dans le cas du transfert de didésoxyribose et par 35 dans le cas du didéhydroribose.

10

TABLEAU 3

	LL	LL G9S	LF	LFA15T
dT + C	100	10	76,5	10,7
ddT + C	0,2	2,5	0,9	2,5
d4T + C	0,5	8	2,1	73,5

Nota : 100% en haut de la colonne LL représente l'activité spécifique de l'enzyme NTD de *L. leichmannii* lors de la réaction dT + C \longleftrightarrow dC + T.

15

Le tableau 4 ci-dessous, montre le détail des résultats de tests d'activité enzymatique pour l'enzyme native et l'enzyme mutée de *B.fermentum* pour chacune des réactions dT + C, ddT + C et d4T + C. On retrouve dans la première colonne du tableau les valeurs de constante d'affinité (Km), dans la seconde, de vitesse maximale de réaction (Vmax), dans la troisième, de constante de catalyse (Kcat), et dans la dernière le rapport des constantes d'affinité et de catalyse (Km/Kcat) rendant compte de l'efficacité des enzymes testées. Ces différentes valeurs ont été mesurées selon le protocole décrit dans la littérature [P A Kaminski (2002) "Functional cloning, heterologous expression and purification of two different N-deoxyribosyltransferases from *Lactobacillus helveticus*" J. Biol. Chem; vol. 277; 14400-14407]. L'enzyme mutée selon le procédé de l'invention montre une meilleure activité catalytique sur d4T et sur ddT que l'enzyme native. Les activités sont augmentées respectivement de 60 % et 54 %. En outre, l'enzyme mutée LFA15T est 60 fois plus efficace que

20

25

l'enzyme native LF dans l'échange ddT + X et 7, 5 fois plus efficace dans l'échange d4T + X.

TABLEAU 4

	Km μM	Vmax μmol/s	Kcat μmol/s/μg	Kcat/km
LF dT	124	6,65	0,665	5,36
LF dT	80	5,7	0,038	0,047
LF d4T	1250	24	0,56	0,448
LFA15T dT	371	9,7	0,242	0,65
LFA15T ddT	53	7,8	0,156	2,9
LFA15T d4T	1,1	18,4	3,68	3,34

5

L'enzyme sélectionnée trouve donc son application dans la synthèse enzymatique de 2',3'-didésoxynucleosides et de 2',3'-didésoxy, 2',3'-didéhydronucleosides de bases naturelles ddC, ddA, dId, d4T, d4C, d4G (Ray *et al* 2002 ; Stuyver *et al*, 2002) ou modifiées (Pokrovsky *et al*, 2001 Chong *et al*, 2002) tels que (1β-3'-fluoro) 2',3'-didésoxy, 2',3'-didéhydro-4'-thio-Nucleosides comportant ou non des radioéléments.

6) Détermination des résidus impliqués dans le site catalytique de l'enzyme Ntd:

Comme le montre l'alignement de la figure 3, les résidus Y(Tyr)13, D (Asp)77, D (Asp) 97, E(Glu)103 et M (Met)132 (numérotation établie par rapport à Ntd de *B. fermentum* – SEQ ID No.2) se trouvent particulièrement conservés chez les protéines Ntd des différents microorganismes représentés. Des expériences de mutagenèse ponctuelle ciblant ces résidus ont permis d'établir qu'ils étaient impliqués dans le site catalytique de l'enzyme. En effet, la mutation d'un de ces résidus entraîne une perte d'activité de l'enzyme de l'ordre de 90 %.

REFERENCES

- Bartolome B, Jubete Y, Martinez E, de la Cruz F. (1991)
 »Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors
 5 compatible with pBR322 and its derivatives. *Gene*. **102** :75-8
- Carson D.A. & Wasson D.B. (1988) Synthesis of
 2',3'-dideoxynucleosides by enzymatic trans-glycosylation. *Biochem. Biophys.
 Res. Comm.* **155** : 829-834.
- Chong Y, Choo H, Choi Y, Mathew J, Schinazi RF, Chu CK.
 10 Stereoselective synthesis and antiviral activity of D-2',3'-didehydro-
 2',3'-dideoxy-2'-fluoro-4'-thionucleosides. *J Med Chem.* 2002 **45**:4888-98.
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. (1988) « High efficiency
 transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. » *Nucleic Acids Res.*
16 :6127-45.
- 15 Fischer, X., Kaun, E. and Genz, U. (1990) 2',3'-
 Dideoxyribofuranosides and process for their production. Ger. Offen. DE
 3840160.
- Pokrovsky AG, Pronayeva TR, Fedjuk NV, Shirokova EA,
 Khandazhinskaya AL, Tarusova NB, Karpenko IL, Krayevsky AA. (2001) Anti-
 20 HIV activity of novel phosphonate derivatives of AZT, d4T, and ddA.
Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. **4-7**:767-9.
- Ray AS, Yang Z, Chu CK, Anderson KS. Novel use of a guanosine
 prodrug approach to convert 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyguanosine into a
 viable antiviral agent. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 **46**:887-91.
- 25 Richaud C, Mengin-Lecreulx D, Pochet S, Johnson EJ, Cohen
 GN, Marliere P. (1993) Directed evolution of biosynthetic pathways.
 Recruitment of cysteine thioethers for constructing the cell wall of *Escherichia
 coli*. *J Biol Chem.* **268** :26827-35.
- Secrist JA 3rd, Riggs RM, Tiwari KN, Montgomery JA. Synthesis
 30 and anti-HIV activity of 4'-thio-2',3'-dideoxynucleosides. *J Med Chem* 1992 **35**:
 533-8
- Stuyver LJ, Lostia S, Adams M, Mathew JS, Pai BS, Grier J,

- Tharnish PM, Choi Y, Chong Y, Choo H, Chu CK, Otto MJ, Schinazi RF. Antiviral activities and cellular toxicities of modified 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrocytidine analogues. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 **46**: 3854-60.
- 5 Van Draanen NA, Freeman GA, Short SA, Harvey R, Jansen R, Szczech G, Koszalka GW. (1996) « Synthesis and antiviral activity of 2'-deoxy-4'-thio purine nucleosides. » *J Med Chem* **39**: 538-42

REVENDICATIONS

1. Procédé pour faire évoluer une protéine X codée par un gène *ntd* de *Lactobacillus fermentum* (*L. fermentum*) de sorte à en modifier ses caractéristiques, comprenant les étapes suivantes :
- 5 a) obtention de mutants du gène *ntd* de *L. fermentum* par mutagenèse aléatoire ;
- b) transformation de cellules comportant un phénotype [P-] avec des vecteurs comportant les acides nucléiques mutés obtenus à l'étape a) codant pour les protéines ainsi modifiées X*, P- signifiant que lesdites cellules sont
- 10 auxotrophes pour la substance P, P étant le produit de l'action de X sur son substrat naturel S ;
- c) mise en culture desdites cellules dans un milieu comprenant un substrat S*, S* étant un analogue du substrat naturel S de ladite protéine X;
- 15 d) sélection des cellules [P- :: X*] qui ont survécu à l'étape c) dans lesquelles les protéines X* sont capables de réaliser la biosynthèse du produit P à partir du substrat S*.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la protéine mutante X* obtenue est une protéine possédant une activité voisine de
- 20 ladite protéine X, c'est-à-dire appartenant à des classes enzymatiques communes ou voisines présentant au moins les trois premiers chiffres 2.4.2 des classes EC de la nomenclature internationale à 4 chiffres.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que les cellules utilisées à l'étape b) sont obtenues par inactivation d'au moins
- 25 un gène impliqué dans la voie métabolique naturelle conduisant au produit P.
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la protéine X* complémente la déficience de la voie métabolique naturelle conduisant au produit P dans un milieu pourvu du substrat S*.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce
- 30 que l'activité de la protéine X sur le substrat S est au moins 2 fois supérieure à son activité sur le substrat S*.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce

que l'activité de la protéine X* sur le substrat S* est au moins 10 fois supérieure à son activité sur le substrat S.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la mutagenèse aléatoire de l'étape a) est effectuée soit par variation de la concentration en manganèse lors de la réaction PCR, soit par utilisation d'analogues de nucléotides promutagènes ou encore par la mise en œuvre d'amorces comprenant une séquence aléatoire.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que lesdites cellules sont des cellules procaryotes ou eucaryotes, de préférence *E. coli*.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce qu'on fait évoluer une N-désoxyribosyltransférase (DTP) de *L.fermentum* de sorte à obtenir une protéine qui est une N-didésoxyribosyltransférase par les étapes suivantes :

- a) obtention de mutants DTP* de la séquence codant pour une N-désoxyribosyltransférase (DTP) par mutagenèse aléatoire ;
- b) transformation de cellules comportant un phénotype [N-] avec des vecteurs comportant les acides nucléiques mutés obtenus à l'étape a) codant pour les protéines DTP*, N- signifiant que lesdites cellules sont auxotrophes pour au moins un nucléoside, ledit nucléoside étant le produit de l'action de DTP sur son substrat naturel dR-N ;
- c) mise en culture desdites cellules dans un milieu comprenant un substrat ddR-N ;
- d) sélection des cellules [N- :: DTP*] qui ont survécu à l'étape c) dans lesquelles les protéines DTP* sont capables de réaliser le transfert du didésoxyribose (ddR) d'un didésoxyribonucléoside à un autre nucléoside conduisant à la production du nucléoside N nécessaire pour la survie des cellules.

10. Procédé selon la revendication 9 caractérisé en ce que la séquence (*ntd*) codant la N-désoxyribosyltransférase (DTP) de *L.fermentum* correspond à SEQ ID No.1 que l'on fait évoluer.

11. Procédé selon l'une des revendications 9 et 10 caractérisé en ce que les cellules utilisées à l'étape b) sont des bactéries de génotype Δ pyrC,

Δcod A, *Δcdd* déficientes dans la voie métabolique conduisant à l'uracile.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que les bactéries de génotype *ΔpyrC*, *Δcod A*, *Δcdd* déficientes dans la voie métabolique conduisant à l'uracile utilisées sont des *E.coli*.

5 13. Protéine N-désoxyribosyltransférase (DTP) mutée susceptible d'être obtenue à partir du procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle présente une activité modifiée.

10 14. Protéine selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle présente une activité N-didésoxyribosyltransférase et/ou une activité sur des analogues de désoxy ou didésoxyribonucléoside comportant une base modifiée.

15 15. Protéine selon la revendication 14 ou 15, caractérisée en ce qu'elle présente une séquence identique au moins à 70 % à SEQ ID No.2 et contenant les résidus Y13, D77, D97, E103, M132.

16 16. Protéine selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle présente une identité de séquence avec SEQ ID No.2 supérieure ou égale à 80 %.

20 17. Protéine présentant une activité N-didésoxyribosyltransférase selon l'une quelconque des revendications 14 à 16, caractérisée en ce que sa séquence comprend SEQ ID No 4.

25 18. Acide nucléique comprenant une séquence codant pour une N-didésoxyribosyltransférase selon l'une quelconque des revendications 13 à 17, telle que la séquence SEQ ID No 3.

19. Vecteur d'expression comprenant un acide nucléique selon la revendication 18.

30 20. Vecteur selon la revendication 19, caractérisé en ce que l'acide nucléique de la revendication 18 est fusionné à un promoteur efficace pour l'expression de ladite séquence codante dans les cellules eucaryotes et/ou procaryotes.

21. Vecteur selon l'une des revendications 19 et 20, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un plasmide capable de transformer et de se maintenir chez *E. coli*.

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour faire évoluer une protéine X codée par un gène *ntd* de *Lactobacillus fermentum* (*L. fermentum*) de sorte à en modifier ses caractéristiques, comprenant les étapes suivantes :

- a) obtention de mutants du gène *ntd* de *L. fermentum* par mutagenèse aléatoire ;
- b) transformation de cellules comportant un phénotype [P-] avec des vecteurs comportant les acides nucléiques mutés obtenus à l'étape a) codant pour les protéines ainsi modifiées X*, P- signifiant que lesdites cellules sont auxotrophes pour la substance P, P étant le produit de l'action de X sur son substrat naturel S ;
- c) mise en culture desdites cellules dans un milieu comprenant un substrat S*, S* étant un analogue du substrat naturel S de ladite protéine X;
- d) sélection des cellules [P- :: X*] qui ont survécu à l'étape c) dans lesquelles les protéines X* sont capables de réaliser la biosynthèse du produit P à partir du substrat S*.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la protéine mutante X* obtenue est une protéine possédant une activité voisine de ladite protéine X, c'est-à-dire appartenant à des classes enzymatiques communes ou voisines présentant au moins les trois premiers chiffres 2.4.2 des classes EC de la nomenclature internationale à 4 chiffres.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que les cellules utilisées à l'étape b) sont obtenues par inactivation d'au moins un gène impliqué dans la voie métabolique naturelle conduisant au produit P.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la protéine X* complémente la déficience de la voie métabolique naturelle conduisant au produit P dans un milieu pourvu du substrat S*.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'activité de la protéine X sur le substrat S est au moins 2 fois supérieure à son activité sur le substrat S*.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce

22.. Cellule hôte comprenant un vecteur selon l'une des revendications 20 à 21.

23. Utilisation d'une N-didésoxyribosyltransférase selon l'une quelconque des revendications 13 à 17 pour le transfert d'un didésoxyribose (ddR) d'un didésoxyribonucléoside sur un autre nucléoside.

24. Utilisation selon la revendication 23, dans la synthèse de 2',3'-didesoxynucléosides.

25. Utilisation selon la revendication 23, dans la synthèse de 2',3'-didéhydro-2',3'-didesoxynucléosides.

26. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 23 à 25 pour la préparation d'analogues de nucléosides ou nucléotides possédant des propriétés antitumorales.

27. Utilisation selon la revendication 26 pour la préparation du ddl ou du ddC.

28. Procédé de préparation de composés comprenant une étape consistant à mettre en œuvre une protéine mutée selon l'une des revendications 13 à 17.

29. Procédé selon la revendication 28 pour la préparation d'analogues de nucléosides ou nucléotides utiles pour le traitement du cancer ou de maladies infectieuses, tels que des didésoxyribonucléosides, comme le ddC et le ddl ou des didéhydro-didesoxyribonucléosides.

30. Souche d'*E. coli* déposée à la CNCM le 22 mars 2004 sous le numéro d'accèsion I-3192.

que l'activité de la protéine X^* sur le substrat S^* est au moins 10 fois supérieure à son activité sur le substrat S .

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la mutagenèse aléatoire de l'étape a) est effectuée soit par variation de la concentration en manganèse lors de la réaction PCR, soit par utilisation d'analogues de nucléotides promutagènes ou encore par la mise en œuvre d'amorces comprenant une séquence aléatoire.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que lesdites cellules sont des cellules procaryotes ou eucaryotes, de préférence *E. coli*.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce qu'on fait évoluer une N-désoxyribosyltransférase (DTP) de *L.fermentum* de sorte à obtenir une protéine qui est une N-didésoxyribosyltransférase par les étapes suivantes :

- a) obtention de mutants DTP^* de la séquence codant pour une N-désoxyribosyltransférase (DTP) par mutagenèse aléatoire ;
- b) transformation de cellules comportant un phénotype [N-] avec des vecteurs comportant les acides nucléiques mutés obtenus à l'étape a) codant pour les protéines DTP^* , N- signifiant que lesdites cellules sont auxotrophes pour au moins un nucléoside, ledit nucléoside étant le produit de l'action de DTP sur son substrat naturel dR-N ;
- c) mise en culture desdites cellules dans un milieu comprenant un substrat ddR-N ;
- d) sélection des cellules [N- :: DTP^*] qui ont survécu à l'étape c) dans lesquelles les protéines DTP^* sont capables de réaliser le transfert du didésoxyribose (ddR) d'un didésoxyribonucléoside à un autre nucléoside conduisant à la production du nucléoside N nécessaire pour la survie des cellules.

10. Procédé selon la revendication 9 caractérisé en ce que la séquence (*ntd*) codant la N-désoxyribosyltransférase (DTP) de *L.fermentum* correspond à SEQ ID No.1 que l'on fait évoluer.

11. Procédé selon l'une des revendications 9 et 10 caractérisé en ce que les cellules utilisées à l'étape b) sont des bactéries de génotype $\Delta pyrC$,

REFERENCES

- Bartolome B, Jubete Y, Martinez E, de la Cruz F. (1991)
5 »Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives. *Gene*. **102** :75-8
- Carson D.A. & Wasson D.B. (1988) Synthesis of
2',3'-dideoxynucleosides by enzymatic trans-glycosylation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **155** : 829-834.
- 10 Chong Y, Choo H, Choi Y, Mathew J, Schinazi RF, Chu CK.
Stereoselective synthesis and antiviral activity of D-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-2'-fluoro-4'-thionucleosides. *J Med Chem*. 2002 **45**:4888-98.
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. (1988) « High efficiency
transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. » *Nucleic Acids Res.*
15 **16** :6127-45.
- Fischer, X., Kaun, E. and Genz, U. (1990) 2',3'-
Dideoxyribofuranosides and process for their production. Ger. Offen. DE
3840160.
- Pokrovsky AG, Pronayeva TR, Fedjuk NV, Shirokova EA,
20 Khandazhinskaya AL, Tarusova NB, Karpenko IL, Krayevsky AA. (2001) Anti-
HIV activity of novel phosphonate derivatives of AZT, d4T, and ddA.
Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. **4-7**:767-9.
- Ray AS, Yang Z, Chu CK, Anderson KS. Novel use of a guanosine
prodrug approach to convert 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyguanosine into a
25 viable antiviral agent. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 **46**:887-91.
- Richaud C, Mengin-Lecreulx D, Pochet S, Johnson EJ, Cohen
GN, Marliere P. (1993) Directed evolution of biosynthetic pathways.
Recruitment of cysteine thioethers for constructing the cell wall of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. **268** :26827-35.
- 30 Secrist JA 3rd, Riggs RM, Tiwari KN, Montgomery JA. Synthesis
and anti-HIV activity of 4'-thio-2',3'-dideoxynucleosides. *J Med Chem* 1992 **35**:
533-8

Δcod A, *Δcdd* déficientes dans la voie métabolique conduisant à l'uracile.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que les bactéries de génotype *ΔpyrC*, *Δcod A*, *Δcdd* déficientes dans la voie métabolique conduisant à l'uracile utilisées sont des *E.coli*.

5 13. Protéine N-désoxyribosyltransférase (DTP) mutée susceptible d'être obtenue à partir du procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle présente une activité modifiée.

10 14. Protéine selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle présente une activité N-didésoxyribosyltransférase et/ou une activité sur des analogues de désoxy ou didésoxyribonucléoside comportant une base modifiée.

15 15. Protéine selon la revendication 13 ou 14, caractérisée en ce qu'elle présente une séquence identique au moins à 70 % à SEQ ID No.2 et contenant les résidus Y13, D77, D97, E103, M132.

16 16. Protéine selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle présente une identité de séquence avec SEQ ID No.2 supérieure ou égale à 80 %.

20 17. Protéine présentant une activité N-didésoxyribosyltransférase. selon l'une quelconque des revendications 14 à 16, caractérisée en ce que sa séquence comprend SEQ ID No 4.

18. Acide nucléique comprenant une séquence codant pour une protéine ayant une activité N-didésoxyribosyltransférase selon l'une quelconque des revendications 13 à 17, telle que la séquence SEQ ID No 3.

25 19. Vecteur d'expression comprenant un acide nucléique selon la revendication 18.

20. Vecteur selon la revendication 19, caractérisé en ce que l'acide nucléique de la revendication 18 est fusionné à un promoteur efficace pour l'expression de ladite séquence codante dans les cellules eucaryotes et/ou procaryotes.

30 21. Vecteur selon l'une des revendications 19 et 20, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un plasmide capable de transformer et de se maintenir chez *E. coli*.

Stuyver LJ, Lostia S, Adams M, Mathew JS, Pai BS, Grier J, Tharnish PM, Choi Y, Chong Y, Choo H, Chu CK, Otto MJ, Schinazi RF. Antiviral activities and cellular toxicities of modified 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrocytidine analogues. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 **46**: 5 3854-60.

Van Draanen NA, Freeman GA, Short SA, Harvey R, Jansen R, Szczech G, Koszalka GW. (1996) « Synthesis and antiviral activity of 2'-deoxy-4'-thio purine nucleosides. » *J Med Chem* **39**: 538-42

22. Cellule hôte comprenant un vecteur selon l'une des revendications 20 à 21.

23. Utilisation d'une protéine ayant une activité N-didésoxyribosyltransférase selon l'une quelconque des revendications 13 à 17 pour le transfert d'un didésoxyribose (ddR) d'un didésoxyribonucléoside sur un autre nucléoside.

24. Utilisation selon la revendication 23, dans la synthèse de 2',3'-didesoxynucléosides.

25. Utilisation selon la revendication 23, dans la synthèse de 2',3'-didéhydro-2',3'-didesoxynucléosides.

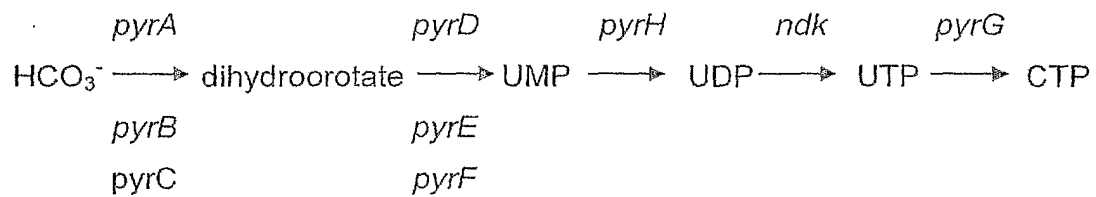
26. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 23 à 25 pour la préparation d'analogues de nucléosides ou nucléotides possédant des propriétés antitumorales.

27. Utilisation selon la revendication 26 pour la préparation du ddl ou du ddC.

28. Procédé de préparation de composés comprenant une étape consistant à mettre en œuvre une protéine mutée selon l'une des revendications 13 à 17.

29. Procédé selon la revendication 28 pour la préparation d'analogues de nucléosides ou nucléotides utiles pour le traitement du cancer ou de maladies infectieuses, tels que des didésoxyribonucléosides, comme le ddC et le ddl ou des didéhydro-didesoxyribonucléosides.

30. Souche d'*E. coli* déposée à la CNCM le 22 mars 2004 sous le numéro d'accèsion I-3192.

Figure 1a : Schématisation de la voie "de novo" de UTP et CTP chez *E. coli*

ndk: nucléoside diphosphokinase

pyrA: carbamoylphosphate synthase

pyrB: aspartate carbamoyltransférase

pyrC: dihydroorotase

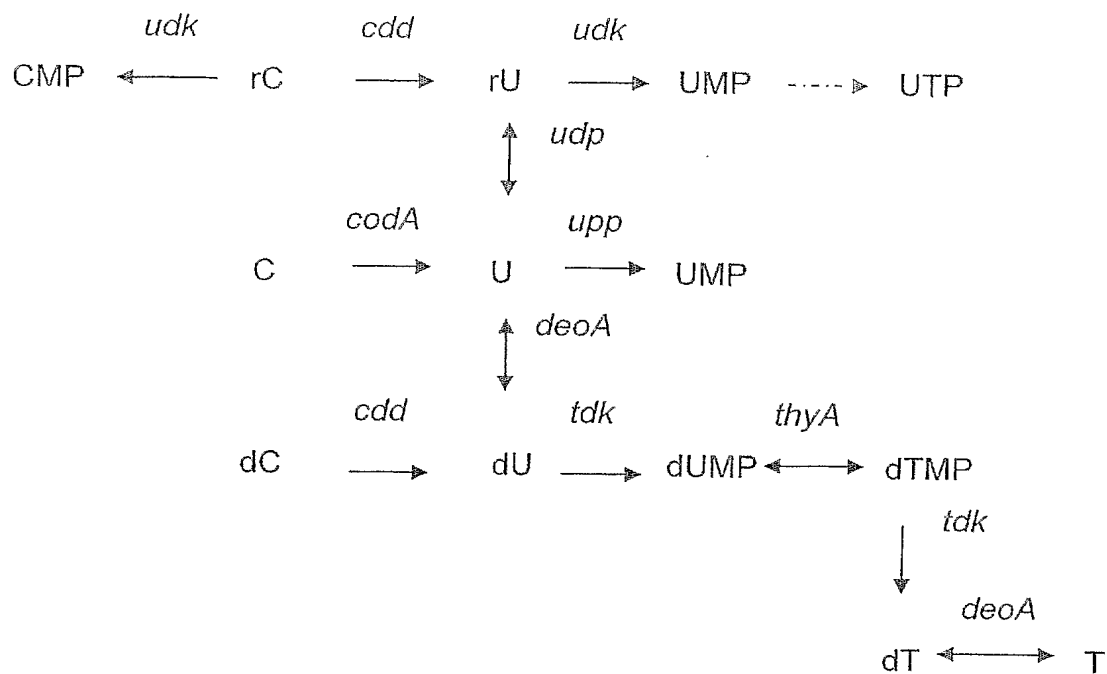
pyrD: dihydroorotate oxydase

pyrE: orotate phosphoribosyltransférase

pyrF: orotidine 5'-phosphate decarboxylase

pyrG: CTP synthétase

pyrH: UMP kinase

Figure 1b: Voie de recyclage des pyrimidines chez *E. coli*

cdd: cytidine/désoxycytidine désaminase

cmk: CMP/dCMP kinase horylase

codA: cytosine désaminase

deoA: thymidine phosphorylase

tdk: thymidine kinase

udk: uridine/cytidine kinase

udp: uridine phosphorylase

upp: uridine phosphoryltransferase

thyA: thymidylate synthase

Les enzymes sont ci-dessus représentées par leurs gènes correspondants.

3/4

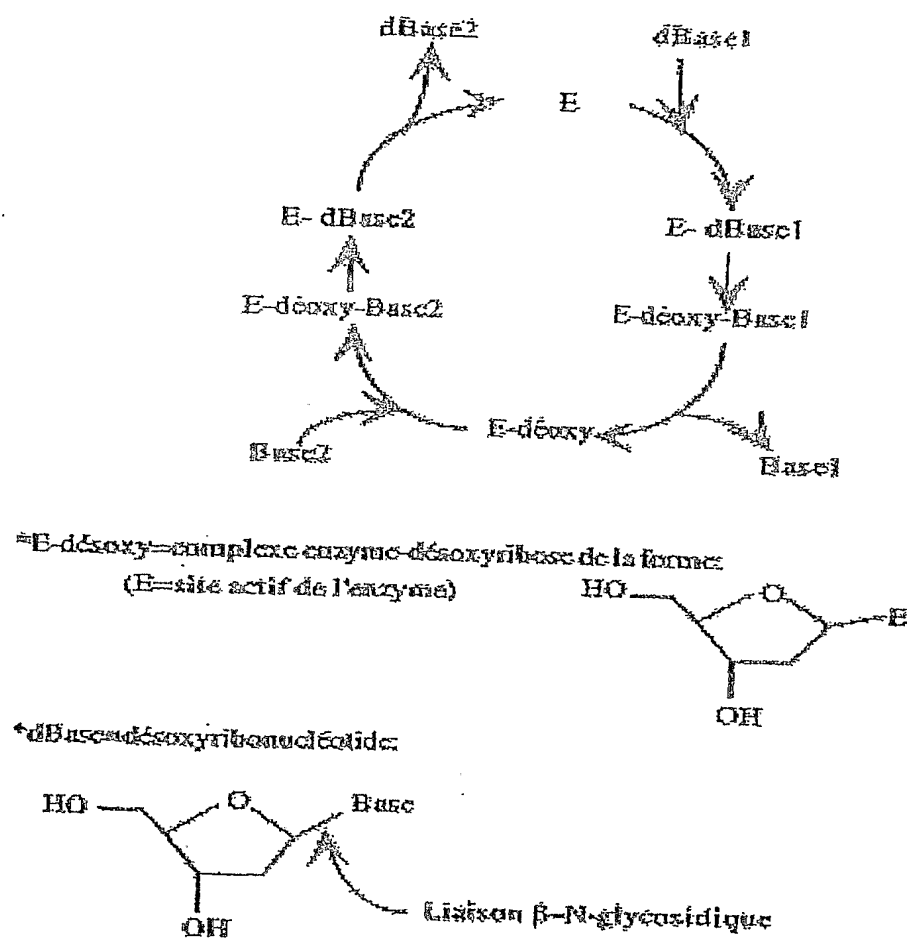


Figure 2

4/4

CLUSTAL W (1.8) multiple sequence alignment

13

```

NTDLh      MNKKKTLYFGAGWFNEKQNK--YKEAMAALKENPTVDLENSYVPLENQYKGIRI
NTDLa      MMAKTKTLYFGAGWFNEKQNK--YKAAMEALKQNPVDLENSYVPLENQYKDIRV
NTDLj      MAGWFTETQNK--YKDAMSALNANPTIDLENSYVPLQYKDIRV
NTDLl      MPKKTLYFGAGWFTDRQNK--YKEAMEALKENPTIDLENSYVPLDNQYKGIRV
NTDLf      LKNTDPVANTKIYLATSFNEEQRR--IPQALAQLEANPTVGVVH--QPFDFQYKDARV
PTDLh      MKAVVPTGKIYLGSPFYSDAQRER--AAKAKELLAKN--LSIAHVFFPFDDGFTDPDE
NTDLmATCC8293 MSQIYLAGPFFSDEQIDR--VKRIEAALDSN-----PTVTDYYSPRK
ProMar      MTRKIIYLASPYGFSKQCKKNLLPEFIAALEDLG-----AEVWEPFSR

```

77 97 103

```

NTDLh      DEHPEYLH-NIEWASATYHNDLVGIKTSVMLGVYLP--EEEDVGLGMELGYALSQGYI
NTDLa      DEHPEYLH-DIEWASATYHNDLIGIKSSDIMLGVYLP--EEEDVGLGMELGYALSQGYI
NTDLj      DEHPEYLH-DKEWAQATYNGDLVGIKTSVMLGVYVP--KEEDVGLGMELGYAMSQGYV
NTDLl      DEHPEYLH-DKVWATATYNNDLNGIKTNDIMLGVIYIP--DEEDVGLGMELGYALSQGYV
NTDLf      DSDPAGVFGSLEWQIATYNNDLNAVGTSDVCVALYDM--DQIDEGICMEIGMFVALHKPI
PTDLh      KNPEIGGIRSMVWRDATYQNDLTGISNATCGVFLYDM--DQLDDGSAFEIGFMRAMHKPV
NTDLmATCC8293 HQKTENPEETSPWAAEVFQDIKNVTDADIILSIIDYRDNDADSGTAFEQGMWVQKKPI
ProMar      NAQYENLQ--PGWAHDIALADLRDVRNSDGILAVVNG--TPPDEGVMIELGAAIALGKPT

```

132

```

NTDLh      LLVIP-----DED-YGKPINLMSWGVCDNAIK----ISELKDFDFENKPRYN-FYDGAVY
NTDLa      LLVIP-----DED-YGKPINLMSWGVCDNAIK----ISELKDFDFENKPRFN-FYDGAVY
NTDLj      LLVIP-----DEL-YGESINLMSWGVADNVIK----MSELATFDENRPRYN-FYDGAVY
NTDLl      LLVIP-----DED-YGKPINLMSWGVSDNVIK----MSQLKDFENFNKPRFD-FYEGAVY
NTDLf      VLLPFTTK--DKSAYEA--NLMLARGVTTWLEPN-DFSPLKDFENFNHPMAQFPPEKVF
PTDLh      ILVPFTEH--PEKEKKM--NLMLAQGVTTIIDGNTEFEKLADYNFNECFNPNVRGYGIY
NTDLmATCC8293 IVFN-----ELKFPV--NLMLSESLTAYITN--SDDIATYDFDQTPKLPTG-ELF
ProMar      FLFRDDFRRCSDSEEYPL--NLMLFAGLPSIGWNDYFYTSIEELSDPKKSLAIWLKD---

```

Figure 3

SEQUENCE LISTING

<110> INSTITUT PASTEUR

<120> N désoxyribosyltransférases de *Lactobacillus fermentum* et application à la synthèse enzymatique de 2',3' didésoxynucléosides et de 2',3' didéhydronucléosides

<130> BIF 116236 FR

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 504

<212> DNA

<213> *Lactobacillus fermentum* filed at Genbank accession N° AY064168

<400> 1

```

atgaaaaata ccgacccagt tgctaacact aaaatttacc tggctaccag cttcttcaac      60
gaagaacaac gtgcccgcac ccctcaagct ctagcccaac tagaagccaa cccgactgtc      120
ggcgttggtt accagccatt cgatttccaa tataaagatg cacgcgtaga ctccgatcct      180
gccggcgtct ttggcagcct cgaatggcaa attgccactt acaataacga cctcaacgcg      240
gtaggaactt ccgatgtctg cgttgcttta tacgatatgg accaaattga cgaaggaatt      300
tgtatggaaa tcggcatggt cgtcgccctc cataaaccta tcgttttact accttttact      360
aagaaagata agtctgctta tgaagctaac ctaatgctag cacgggggtgt aactacctgg      420
ttggaacctt atgacttttag tcccttaaaa gactttaact ttaaccaccc aatgggtcaa      480
cctttcccac cattcaaggt ttctt                                     504

```

<210> 2

<211> 168

<212> PRT

<213> *Lactobacillus fermentum*

<400> 2

```

Met Lys Asn Thr Asp Pro Val Ala Asn Thr Lys Ile Tyr Leu Ala Thr
1           5           10           15

```

```

Ser Phe Phe Asn Glu Glu Gln Arg Ala Arg Ile Pro Gln Ala Leu Ala
20           25           30

```

```

Gln Leu Glu Ala Asn Pro Thr Val Gly Val Val His Gln Pro Phe Asp
35           40           45

```

Phe Gln Tyr Lys Asp Ala Arg Val Asp Ser Asp Pro Ala Gly Val Phe
 50 55 60

Gly Ser Leu Glu Trp Gln Ile Ala Thr Tyr Asn Asn Asp Leu Asn Ala
 65 70 75 80

Val Gly Thr Ser Asp Val Cys Val Ala Leu Tyr Asp Met Asp Gln Ile
 85 90 95

Asp Glu Gly Ile Cys Met Glu Ile Gly Met Phe Val Ala Leu His Lys
 100 105 110

Pro Ile Val Leu Leu Pro Phe Thr Lys Lys Asp Lys Ser Ala Tyr Glu
 115 120 125

Ala Asn Leu Met Leu Ala Arg Gly Val Thr Thr Trp Leu Glu Pro Asn
 130 135 140

Asp Phe Ser Pro Leu Lys Asp Phe Asn Phe Asn His Pro Met Ala Gln
 145 150 155 160

Pro Phe Pro Pro Phe Lys Val Phe
 165

<210> 3

<211> 504

<212> DNA

<213> Lactobacillus fermentum

<400> 3

```

atgaaaaata cgcaccagtg tgctaact aaaatttacc tgactaccag cttcttcaac      60
gaagaacaac gtgccgcat ccctcaagct ctagcccaac tagaagccaa cccgactgtc      120
ggcgttggtc accagccatt cgatttccaa tataaagatg cacgcgtaga ctccgatcct      180
gccggcgtct ttggcagcct cgaatggcaa attgccactt acaataacga cctcaacgcg      240
gtaggaactt ccgatgtctg cgttgcttta tacgatatgg accaaattga cgaaggaatt      300
tgtatggaaa tcggcatggt cgtcgccctc cataaaccta tcgttttact accttttact      360
aagaaagata agtctgctta tgaagctaac ctaatgctag cacgggggtgt aactacctgg      420
ttggaacctt atgacttttag tcccttaaaa gactttaact ttaaccaccc aatgggtcaa      480
cctttcccac cattcaaggt ttct                                     504

```

<210> 4

<211> 168
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus fermentum A15T

<400> 4

Met Lys Asn Thr Asp Pro Val Ala Asn Thr Lys Ile Tyr Leu Thr Thr
 1 5 10 15

Ser Phe Phe Asn Glu Glu Gln Arg Ala Arg Ile Pro Gln Ala Leu Ala
 20 25 30

Gln Leu Glu Ala Asn Pro Thr Val Gly Val Val His Gln Pro Phe Asp
 35 40 45

Phe Gln Tyr Lys Asp Ala Arg Val Asp Ser Asp Pro Ala Gly Val Phe
 50 55 60

Gly Ser Leu Glu Trp Gln Ile Ala Thr Tyr Asn Asn Asp Leu Asn Ala
 65 70 75 80

Val Gly Thr Ser Asp Val Cys Val Ala Leu Tyr Asp Met Asp Gln Ile
 85 90 95

Asp Glu Gly Ile Cys Met Glu Ile Gly Met Phe Val Ala Leu His Lys
 100 105 110

Pro Ile Val Leu Leu Pro Phe Thr Lys Lys Asp Lys Ser Ala Tyr Glu
 115 120 125

Ala Asn Leu Met Leu Ala Arg Gly Val Thr Thr Trp Leu Glu Pro Asn
 130 135 140

Asp Phe Ser Pro Leu Lys Asp Phe Asn Phe Asn His Pro Met Ala Gln
 145 150 155 160

Pro Phe Pro Pro Phe Lys Val Phe
 165

<210> 5
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> amorce

<400> 5
caatttcaca caggaaacac atatgaccat gattacgcc

39

<210> 6
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> amorce

<400> 6
tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca c

31

<210> 7
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> amorce

<400> 7
gatatacata tgaaaaatac cgacccagtt gc

32

<210> 8
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> amorce

<220>
<221> misc_feature
<223> n est un nucléotide comportant une base A, T, C ou G

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> n est un nucléotide comportant une base A, T, C ou G

<400> 8
nnggatcctt aggttagtta gaaaaccttg aatggtggg

39

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> amorce

<400> 9
ttaataacgac tcactatagg gg

22

<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> amorce

<400> 10
gctagttatt gctcagcgg

19

<210> 11
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> amorce

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n est un nucléotide comportant une base A, T, C ou G

<400> 11
ngatatacat atgaaaaata ccgacccagt tgc

33

<210> 12
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> amorce

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> n est un nucléotide comportant une base A, T, C ou G

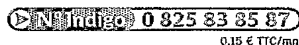
<400> 12
nnggatcctt aggttagtta gaaaaccttg aatggtggg

39



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT



Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

BREVET D'INVENTION**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*03

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.. / 1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 210103

Vos références pour ce dossier (facultatif)		BIF116236
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0402319
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) N-désoxyribosyltransférases de Lactobacillus fermentum et application à la synthèse enzymatique de 2',3'-didésoxynucléosides et de 2',3'-didéhydro-2',3'-didésoxynucléosides.		
LE(S) DEMANDEUR(S) : INSTITUT PASTEUR		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1 Nom		KAMINSKI
Prénoms		Pierre Alexandre
Adresse	Rue	4, rue Bailly
	Code postal et ville	75003 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Le 30 Mars 2004 Georges PERIN N° 92.1194 SANTARELLI		

La loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
 Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.



11-11-11

